

## ENZYMIC COMPOSITION

**Publication number:** JP10004958 (A)

**Publication date:** 1998-01-13

**Inventor(s):** SOUPPE JEROME; NAEYE THIERRY JEAN-BERNARD +

**Applicant(s):** GIST BROCADES NV +

**Classification:**

- **international:** **A21D2/24; A21D8/04; C12N9/04; C12N9/50; A21D2/00; A21D8/02; C12N9/04; C12N9/50;** (IPC1-7): A21D2/24; A21D8/04; C12N9/04; C12N9/50 [more >>](#)

- **European:** A21D8/04B

**Application number:** JP19970065896 19970319

**Priority number(s):** EP19960200760 19960319

### Also published as:

 JP4429392 (B2)  
 US5942262 (A)  
 ZA9702396 (A)  
 PT796559 (E)  
 MX9701998 (A)

### Abstract of JP 10004958 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a composition, capable of readily producing effects similar to those of a metabisulfite in a dough, e.g. the one for baking used in producing biccuits and substitutive for the metabisulfite by including an enzyme capable of producing an oxidizing agent and a protease at least inactivated by oxidation therein. **SOLUTION:** This enzymic composition comprises (A) an enzyme capable of producing an oxidizing agent and (B) a protease at least partially inactivated by oxidation with the oxidizing agent. The protease capable of softening a dough only at the start of preparation of the dough can be made to act thereon to reduce the shrinkage percentage of the dough. Thereby, a regular size of a baked product such as a biscuit can be obtained.

.....  
 Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-4958

(43)公開日 平成10年(1998) 1月13日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N	9/04		C 1 2 N	9/04
A 2 1 D	2/24		A 2 1 D	2/24
	8/04			8/04
C 1 2 N	9/50		C 1 2 N	9/50

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平9-65896	(71)出願人	594178859 ギスト プロカデス ベスローテン フェ ンノートシャップ オランダ 2600エムア デルフト ペーオ ーボックス 1 ワーテリングセウエーグ 1
(22)出願日	平成9年(1997) 3月19日	(72)発明者	ジェローム スーブ フランス 59290 ヴァスカル アベニユ ー ド ラ リベルテ 64
(31)優先権主張番号	9 6 2 0 0 7 6 0 : 5	(72)発明者	ティエリー ジャン ベルナール ナエイ エ フランス 59150 ワーテルロー リュー フラン リスト 8
(32)優先日	1996年 3月19日	(74)代理人	弁理士 中村 稔 (外7名)
(33)優先権主張国	オランダ (NL)		

(54)【発明の名称】 酵素組成物

(57)【要約】

【課題】 ペーキング用のダウに用いることができる酵  
素組成物を提供すること。

【解決手段】 (a) 酸化剤による酸化で少なくとも部分  
的に不活性化されるプロテアーゼ; 及び(b) 酸化剤を生  
成する酵素を含有する酵素組成物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 酸化剤による酸化で少なくとも部分的に不活性化されるプロテアーゼ；及び(b) 該酸化剤を生成する酵素を含有することを特徴とする酵素組成物。

【請求項2】 上記プロテアーゼが、チオプロテアーゼ、任意にはパパイン又はブロメラインである、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 上記酸化剤が $H_2O_2$ である、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項4】 上記酸化剤を生成する酵素がグルコース酸化酵素、スルフヒドリル酸化酵素又はアミノ酸酸化酵素である、請求項1～3の何れか1項に記載の組成物。

【請求項5】 上記プロテアーゼがパパイアから得られるパパインである、請求項1～4の何れか1項に記載の組成物。

【請求項6】 上記(b)の酵素がアスペルギルス・ニガーから得られるグルコース酸化酵素である、請求項1～5の何れか1項に記載の組成物。

【請求項7】 請求項1～6の何れか1項に記載の酵素組成物及び他の生地成分を含有するベーキングに適した生地。

【請求項8】 上記プロテアーゼが、 $10^6 \sim 10^7$  N F/k g -小麦粉存在する、請求項7記載の生地。

【請求項9】 上記酵素が、 $500 \sim 1500$  SU/k g -小麦粉で存在する、請求項7又は8記載の生地。

【請求項10】 下記成分を混合する工程を含む、ベーキングに適した生地の製造方法。

(a) 酸化剤によって少なくとも部分的に不活性化されるプロテアーゼ；

(b) 該酸化剤を生成する酵素；

(c) 小麦粉；及び

(d) 水

【請求項11】 小麦粉及び水を含む生地に、請求項1～6の何れか1項に記載の酵素組成物を添加する、請求項10記載の方法。

【請求項12】 (i) (a) 酸化剤によって少なくとも部分的に不活性化されるプロテアーゼ；

(b) 酸化剤を生成する酵素；

(c) 小麦粉及び水、を含有する生地を供給し；

(ii) 生地を焼成する、ことを特徴とする、バークされた製品の製造方法。

【請求項13】 請求項12記載の方法で生成されたバークされた製品。

【請求項14】 生地の製造、又はバークされた製品の調製ために、酸化によってプロテアーゼを不活性化させる、酸化剤を生成する酵素の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、酸化剤を生成する酵素及び該酸化剤によって不活性化されるプロテアーゼ

を含有する組成物に関する。該組成物は、ベーキング用の生地として用いられる。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 一般に、ベーキング産業(baking industry)において、生地を軟らかくするためにメタ重亜硫酸塩が用いられている。特に、亜硫酸塩は、ビスケット産業において、生地断片が小さくなること、及びベーキング製品が不揃いのサイズになることを減少させるのに用いられる。生地は、当然、酵母、糖、酵素及び炭酸水素ナトリウム等を含むかもしれないが、生地は最小限の小麦粉及び水を含む。亜硫酸塩は、分子間共有S-S結合(inter covalent S-S bridge)を形成することを妨げる方法でグルテン蛋白と反応すると考えられる(C.E.Stauffer(1994), The Science of Cookie and Cracker Production ed. by Hamed Faridi, Chapman & Hall New York London, Chapter 6, p.237-238)。生地中での亜硫酸塩の効果はほとんど即時で、伸びのなく弾力性のない生地となる。また、亜硫酸塩は、グルテン構造の破壊を増強する小麦プロテアーゼを活性化する(H.S.Olcott, L.A.Sapirstein, M.J.Blish, Cereal Chem.(1943) 20(1), 87-97)。システム及びグルタチオンも、同様の効果を示す(C.O.Swanson, A.C.Andrews, Cereal Chem. (1945)22(3), 134-149)。

【0003】 パパインは、小麦グルテンの改良に適用された最初の酵素の一つである(C.O.Swanson, A.C.Andrews, Cereal Chem. (1945) 22(3), 134-149; R.H.Harris, J.Jr Johnson, Cereal Chem. (1940) 17(3), 203-222)。

微生物プロテアーゼの利用も、多くの特許で開示されている：米国特許第3,157,513号、米国特許第1,377,798号、米国特許第4,100,151号、英国特許第2007960号及びドイツ特許出願DE 3002679 A1。微生物プロテアーゼは、EP 0384303に記載されたように、ブタ臍臓酵素と組み合わせることができる。M.Friedrich, J.Noack, R.Noack, Die Nahrung(1982) 26(9) 811-822; J.I.Tschimirov, K.D.Schweinke, D.Augustat, V.Tolstoguzov, Die Nahrung (1983) 27(7) 659-668に記載されたように、小麦グルテンの部分酵素的加水分解が、サーモアクチノミセス・ブルガリス(Thermoactinomyces vulgaris)由来のプロテアーゼを用いて記載されている。プロテアーゼはグルテンのペプチド結合を加水分解するので、亜硫酸塩と比較して、異なった様式で機能する。これも、生地の収縮の度合いを低くし、ビスケットをより正規のサイズの揃ったものとする。それにもかかわらず、このようなプロテアーゼの作用は時間依存性である。これは、生地中でのプロテアーゼの利用における主要な限定要因である。なぜなら、ビスケット製造業者は生地の静置時間(resting time)についてのいくつかの自由度を必要とするからである。これは、亜硫酸塩等の還元剤の迅速な効果によって可能であるが、プロテアーゼの連続的な作用

で管理するのは容易でない。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】驚くべきことに、酵素の新規な組み合わせによって、ビスケットの製造業者に生地中の亜硫酸塩と類似の効果を容易に奏することができるを見出した。本発明によれば、酸化によって不活性化されるプロテアーゼ、及びこのような酸化を起こすことができる酵素の組み合わせが開示される。該酵素の組み合わせは、生地、例えば、ビスケットの製造等のベーキング用生地中のメタ亜硫酸塩を置換することができる。

#### 【0005】

【発明の実施の形態】酸化に感受性のプロテアーゼは、好ましくは、チオプロテアーゼ、例えば、パパイン又はプロメライン等である。酸化酵素は、好ましくは、一定時間後にプロテアーゼを不活性化する $H_2O_2$ （過酸化水素）等の酸化剤を生成する。好ましくは、酵素はグルコース酸化酵素、スルフヒドリル酸化酵素又はアミノ酸酸化酵素である。良好な結果は、ギスト ブロカデスから商標プロテアーゼ V100 で市販されている、パパイヤ(Carica papaya)由来のパパインと、好ましくは、(例えば、真菌由来の)ギスト ブロカデスから商標マキサザイム(Maxazyme) GO 1500で市販されているアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)由来のグルコース酸化酵素との組み合わせで得られる。生地の調製の開始時だけに活性なプロテアーゼを用いることによって、生地が小さくなることを減少し、ビスケット等のベークされた製品の規則正しいサイズが得られるだろう。次いで、酸化剤濃度が特定の(不活性)レベルにまで到達した時に(各々の)プロテアーゼの作用は実質的に減少される。従って、十分な酸化剤の生成に必要な酵素の要求量は、プロテアーゼの酸化安定性の機能、存在するプロテアーゼの量、酸化剤の効果、及びプロテアーゼ活性が所望のレベルにまで減少するまでに要する時間による。プロテアーゼ(NF)の活性は、pH6.0、40℃で60分間におけるカゼインの加水分解により測定する。1NF単位は、残留蛋白をトリクロロ酢酸で沈殿させた後の1時間当たりの1 $\mu$ gチロシン当量を遊離するのに必要な酵素量である。

【0006】酸化酵素の活性は、一般にバッファー(pH5.4付近)中、37℃付近の温度で10分間の基質の酸化によって測定することができる。生成した過酸化水素は、ワサビパーオキシダーゼ及びO-ジアニシジンジヒドロクロライドの存在下で測定する。一般には、生地に $10^5 \sim 10^9$  NF/kg-小麦粉、好ましくは $10^6 \sim 10^8$  NF/kg-小麦粉のプロテアーゼが添加される(又は存在する)。小麦粉1kg当たり、50～50000SU、好ましくは100～200SUの、例えばグルコース酸化酵素等の酸化剤を生成する酵素が、生

地に添加される。例としてグルコース酸化酵素をとると、グルコース酸化酵素(GOX)は、ワサビパーオキシダーゼ(POD-IIの40mg/ml、ペーリンガーマンハイムから入手可能)及びO-ジアニシジンジクロロヒドレート(130mg/ml)の存在下、0.1Mフタル酸バッファー(pH5.4)中、37℃、10分間のグルコース(0.11M)の酸化によって測定する。1SUは、試験条件下、0.4 $\mu$ mol酸素/分を消費するのに必要な酵素の量である。過酸化水素がSOXの基質(グルタチオン)と反応するので、スルフヒドリル酸化酵素(SOX)は、上記方法で測定することができない。その代わりに、スルフヒドリル酸化酵素の活性は、Young及びNimmo(Biochem.J. 130(1972) 33)に記載されたような、基質グルタチオンの減少を測定することによって測定される。1スルフヒドリル酸化酵素単位は、8mモルのGSH(グルタチオン)及び40mモルの酢酸ナトリウムを含む試験混合物(25℃におけるpH5.5)から1 $\mu$ mol酸素/分を消費するのに必要な酵素量に等しい。SOXの1単位によって生産される過酸化水素の量は、GOXの1単位(SU)に等しい。

【0007】ファリノグラフの利用及びその解説  
ファリノグラフは、混合する間の生地の抵抗を測定し、記録する。この装置によって、メタ亜硫酸塩及びプロテアーゼ等の生地の稠度に影響を及ぼす化合物の効果を測定することが可能になる。約500BU(Brabander単位)の稠度が、パンのベーキングに良い稠度である。生地中のグルテンがプロテアーゼにより加水分解されると、デンプン及び加水分解されたタンパク質を含む得られた混合物は、100～200BUの最終稠度を有する。ビスケットのベーキングのためには、好ましい稠度はパンの生地の稠度と完全に加水分解された生地との間であり、例えば、好ましくは300～400BUである。DS<sub>15</sub>単位は、最大及び最大の15分間のファリノグラフカーブにおける減少である。

#### 【0008】

【実施例】本発明は、以下の実施例及び図面について、例としてのみ記載される。

##### 実施例1

生地を、300gの小麦粉及び水(最終容量188ml)から、少なくとも20分間ファリノグラフ中で混合することにより、コントロールとして、又はプロテアーゼ及び/又は酸化酵素とともに、小麦粉から調製した。その試験において、GOXを加え、生地には、グルコース(2g/小麦粉1kg)が追加された。4種の生地で種々のパラメーターを測定し、その結果を以下の表1に示す。

#### 【0009】

##### 【表1】

試験番号 酵素 濃度/kg-小麦粉 BU<sub>max</sub> DS<sub>15</sub> BU<sub>width</sub> 関連図面

1	なし	0	500	100	70	図1
2	パパイン	14.5×10 <sup>6</sup> NF	450	290	10	図2
3	G O X	1000 SU	490	90	80	
4	パパイン	14.5×10 <sup>6</sup> NF	520	130	40	図3
	+ G O X	+1000 SU				

DS<sub>15</sub>; BU (Brabender 単位) における 15 分後の柔軟さの程度

BU<sub>width</sub>; 15 分の混合時間後のファリノグラフトレースの幅。典型的には、プロテアーゼの効果は、ファリノグラフの狭いトレースをあたえている値を下げることである。

【0010】結果は、グルコース酸化酵素がパパイン活性を減少することができることを示す。図から、得られた生地がビスケットのベーキングには不適當であるように、パパインが多量のグルテンを加水分解することが明らかである。しかし、パパイン及び G O X の組み合わせが、好ましいレベルへの稠度の迅速な減少を起こす。このレベルは、時間が経ったら多かれ少なかれ一定のままである。延長された混合は、多分、G O X によって生成

された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるグルテンの間接的酸化のために、稠度の増加を起こすことができる。

#### 実施例 2

##### グルコース濃度の影響

試験を、生地中のグルコースの濃度を種々代えて実施例 1 の試験番号 4 を実施した。

【0011】

【表 2】

試験	グルコース g/kg-小麦粉	BU <sub>max</sub>	370BU に達するまでの混合時間
1	0	490	24分
2	2	520	15分
3	10	520	14分

【0012】パパイン及び G O X の最適なレベルは、調理方法及び処理条件に依存する。例えば、表 2 に示す結果に見られるように、グルコース濃度は G O X の活性に影響を及ぼす。グルコースは、小麦粉中に既に存在する（追加なしで）。従って、もし必要なら G O X 及びパパインの組み合わせはグルコースを追加せずに機能し得る。結果は、グルコースの添加が、迅速に小麦粉が強度（稠度）を回復するのを可能にすることを示す。ファリノグラフに見られるように、稠度は最初は減少し、増加して G O X だけが存在するときの値より高い値に戻る。多分、G O X によって生成された過酸化水素の一部のみがパパインを停止するのに用いられ、一部は、グルテン

ネットワークの強化するために小麦粉中のパーオキシダーゼによって用いられる。グルコースの効果は、小麦粉の強度の回復を迅速にするようにする過酸化水素を発生させることである。

#### 実施例 3

##### G O X 濃度の影響

試験を、生地中に加える G O X の濃度を種々代えて実施例 1 の試験番号 4 を実施した（パパインは、実施例 1 の試験番号 4 のレベルで存在させた）。

【0013】

【表 3】

試験番号	G O X 添加 Su/-kg小麦粉	BU <sub>max</sub>	DS <sub>15</sub>	BU <sub>width</sub>
1	0	450	290	10
2	100	470	240	10
3	500	500	150	20
4	1000	520	130	40

【0014】表 3 に示す結果は、G O X が増加すると、生地の稠度が高くなることを示す。

#### 実施例 4

##### 生地の安定性

試験を、実施例 1 の試験番号 2 及び 4 に記載されたように行い、亜硫酸塩のコントロールと比較した。最初の工

程での混合時間は 15 分であった。1 時間及び 5 時間の静置時間後に生地の粘度を測定した。グルコースは、生地中に 2g/kg-小麦粉存在した。

【0015】

【表 4】

試験番号	酵素	BU <sub>max</sub>	BU <sub>1h</sub>	BU <sub>5h</sub>	BU <sub>width, 1h</sub>	DS <sub>15</sub>
1	パパイン	450	180	180	10	290
2	パパイン + G O X	520	320	240	40	130

試験番号3においては、200ppmの亜硫酸塩を用いた。ビ  
スケットの製造における濃度は、生産物及び必要な工程  
に依存し、200～1200ppmの範囲であるかもしれ  
ない。BU<sub>5h</sub>は、亜硫酸塩が高濃度になることにより低  
くなるだろう。パパインと連結したGOXの効果は、亜  
硫酸塩と同様の方法で安定化するために十分に生地を強  
くすることであった。

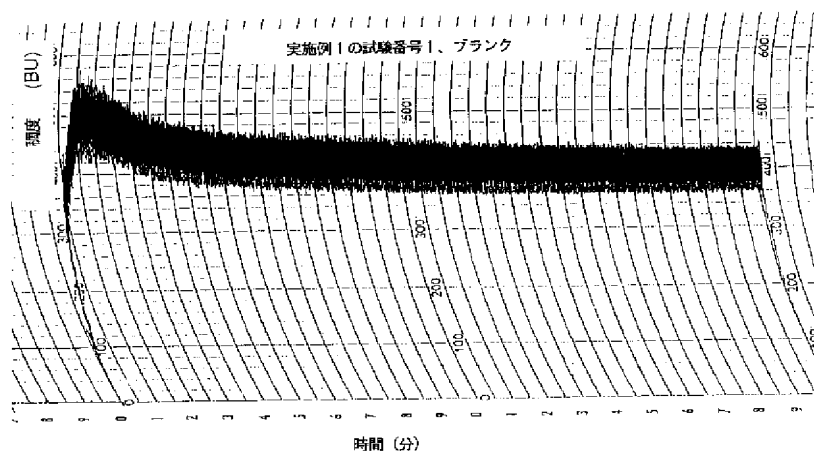
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の試験番号1の生地のファリノグラフ  
である。

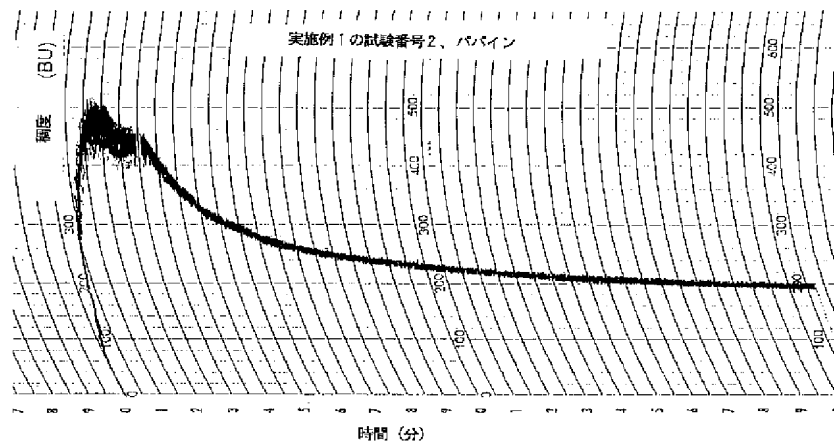
【図2】実施例1の試験番号2の生地のファリノグラフ  
である。

【図3】実施例1の試験番号4の生地のファリノグラフ  
である。

【図1】



【図2】



【図3】

